

# ELECTROPHORESIS OF HIGH PERFORMANCE MICROCAPILLARY GEL

**Publication number:** JP3163353 (A)

**Publication date:** 1991-07-15

**Inventor(s):** KARGER BARRY L [US]; COHEN AHARON S [US]; HEIGER DAVID N [US] +

**Applicant(s):** UNIV NORTHEASTERN [US] +

**Classification:**

- **international:** **B01D57/02; G01N27/447; B01D57/02; G01N27/447;** (IPC1-7): G01N27/447

- **European:** B01D57/02; G01N27/447B3A; G01N27/447B6

**Application number:** JP19900241027 19900911

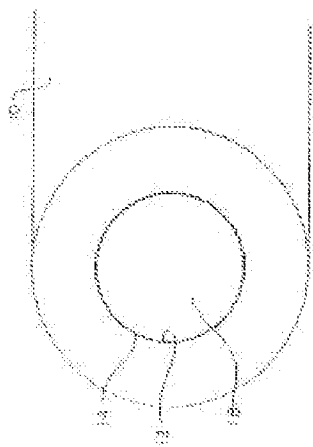
**Priority number(s):** US19890406080 19890912; US19890421609 19891013

**Also published as:**

JP2964162 (B2)  
EP0417925 (A2)  
EP0417925 (A3)  
CA2025052 (A1)

## Abstract of JP 3163353 (A)

**PURPOSE:** To obtain a gel charging microcapillary tube column providing excellent stability, efficiency and separative power by providing a microcapillary tube, a polymer gel in the inner hole of the tube and a thin layer of a coating material. **CONSTITUTION:** The high performance microcapillary tube gel electrophoresis comprises a microcapillary tube 10, a layer 12 of a coating material covalent bonding to the inner surface of the wall of the tube 10, and a polymer gel material 18 in the cavity of the tube 10. The tube 10 may be manufactured by any materials if the detector used for an electrophoresis is suitably operated with the example material. The material 18 may be any polymer having a variable pore structure. The gel is crosslinked polymer varying by altering the quantities of monomer and crosslinker and reacting conditions.; The layer 12 between the material 18 and the inner surface 14 of the wall of the tube 10 is normally hydrophobic material, and obtained from a coating reagent capable of chemically bonding to the wall of the tube 10. The mixture of a specimen is analyzed as the linear function of the logarithm of the molecular weights.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-163353

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)7月15日

G 01 N 27/447

7235-2G  
7235-2G

G 01 N 27/26

3 1 5 Z  
E

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全21頁)

⑭発明の名称 高性能マイクロ毛管ゲル電気泳動

⑯特 願 平2-241027

⑰出 願 平2(1990)9月11日

優先権主張 ⑱1989年9月12日⑲米国(US)⑳406080

⑳発 明 者 バーリー・エル・カー アメリカ合衆国 02159 マサチューセッツ州 ニュートン、デボラ・ロード 62

㉑発 明 者 アハロン・エス・コー アメリカ合衆国 02146 マサチューセッツ州 ブルックリン、アルトン・ブレイス 49、アプト 1

㉒出 願 人 ノースイースタン・ユニバーシティ アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州 ポストン、ハンチントン・アベニュー 360

㉓代 理 人 弁理士 秋元 輝雄

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

高性能マイクロ毛管ゲル電気泳動

## 2. 特許請求の範囲

(1) 高精度・高性能電気泳動用ゲル充填マイクロ毛管カラムであって、

内部穴と内表面を備えた壁とを有するマイクロ毛管、

上記壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層、及び

上記内部穴を満たす重合体ゲル、を具備するゲル充填マイクロ毛管カラム。

(2) 前記マイクロ毛管が石英ガラスで作製されている請求項1記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(3) 前記重合体ゲルが重合非架橋単量体からなる請求項1記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(4) 前記重合体ゲルが、アクリルアミドと少なくとも1つの架橋剤との共重合体からなる請求項1記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(5) 前記塗被材料が、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、3-メタクリルオキシプロピルジメチルエトキシシラン、ビニルトリアセトキシシラン、ビニルトリ(メトキシエトキシ)シラン、ビニルトリクロロシラン及びメチルビニルジクロロシランからなる群から選択される二官能価試薬に由来する請求項1記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(6) 高精度・高性能電気泳動用ゲル充填マイクロ毛管カラムであって、

内部穴と、内表面を備えた壁と、10~200ミクロンの間の内径とを有する石英マイクロ毛管、

上記壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層であって、該塗被材料は、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン又は3-メタクリルオキシプロピルジメチルエトキシシランに由来するもの、及び

上記内部穴を満たすポリアクリルアミドからなるゲル、を具備するゲル充填マイクロ毛管カラム。

(7) 前記ゲルが、アクリルアミド単量体とN, N'-メチレンビスアクリルアミド架橋剤との共重合体である請求項6記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(8) 高分離能分子篩い電気泳動を実施する方法であって、

分離されるべき検体を含有する試料のアリコート、ゲル充填マイクロ毛管カラムであって、内部穴と内表面を備えた壁とを有するマイクロ毛管、該壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層及び該内部穴を満たす重合体ゲルを具備するものに注入し、

少なくとも100ボルト/cmの電界を印加し、そして

分離された検体を機器を用いて逐次的に検出・測定する、方法。

(9) 高精度・高性能電気泳動用ゲル充填マイクロ毛管カラムであって、

内部穴と内表面を備えた壁とを有するマイクロ

キシシラン、ビニルトリクロロシラン及びメチルビニルジクロロシランからなる群から選択される二官能価試薬に由来する請求項9記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(14) 高精度・高性能電気泳動用ゲル充填マイクロ毛管カラムであって、

内部穴と、内表面を備えた壁と、10~200ミクロンの間の内径とを有する石英マイクロ毛管、

上記壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層であって、該塗被材料は、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン又は3-メタクリルオキシプロピルジメチルエトキシシランに由来するもの、

上記塗被材料の層上に吸着されるポリエチレングリコールの層、及び

上記内部穴を満たすポリアクリルアミドからなるゲル、

を具備するゲル充填マイクロ毛管カラム。

(15) 前記ゲルが、アクリルアミド単量体とN, N'-メチレンビスアクリルアミド架橋剤との共

毛管、

上記壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層、

上記塗被材料の層に吸着された親水性重合体の層、及び

上記内部穴を満たす重合体ゲル、を具備するゲル充填マイクロ毛管カラム。

(10) 前記マイクロ毛管が石英ガラスで作製されている請求項9記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(11) 前記親水性重合体がポリエチレングリコールである請求項9記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(12) 前記重合体ゲルが、アクリルアミドと少なくとも1つの架橋剤との共重合体からなる請求項9記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(13) 前記塗被材料が、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、3-メタクリルオキシプロピルジメチルエトキシシラン、ビニルトリアセトキシシラン、ビニルトリ(メトキシエト

重合体である請求項14記載のゲル充填マイクロ毛管カラム。

(16) 高分離能分子篩い電気泳動を実施する方法であって、

分離されるべき検体を含有する試料のアリコートを、ゲル充填マイクロ毛管であって、内部穴と内表面を備えた壁とを有するマイクロ毛管、該壁の上記内表面に共有結合した塗被材料の層、該塗被材料の層上に吸着された親水性重合体の層及び該内部穴を満たす重合体ゲルを具備するものに注入し、

少なくとも100ボルト/cmの電界を印加し、そして

分離された検体を機器を用いて逐次的に検出・測定する、

方法。

### 3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、電気泳動に関し、特に、高性能電気泳動用ゲル充填マイクロ毛管カラムに関する。

〔従来の技術〕

電気泳動は、生物科学において最も広く用いられている分離技法の1つである。ペプチド、蛋白質及びオリゴヌクレオチドのような分子種は、電界の影響下にある緩衝液中でそれらを泳動させることにより、分離される。この緩衝液は、対流混合の発生を最小にするためのアガロース又はポリアクリルアミドのような適切なゲル剤であって、低濃度から中濃度のものと共に、通常は使用される。

2つの主要な分離機構、即ち、検体の有効電荷における差異に基づく分離と分子の大きさに基づく分離とが、存在する。これらの分離機構の内の第1のものは、オリゴヌクレオチドの分離の場合、低い分子量から中位の分子量の材料に限定される。何故ならば、高分子量範囲においては、これらの材料の有効電荷が同じようになり、それらを分離することが困難又は不可能になる。蛋白質の場合、電荷及び大きさが、分離を達成すべく、独立に使用され得る。分子の大きさに基づく分離は、分子

記載されている。この本の内容は、参照によって本明細書中に組み入れられている。

時には、変性のリスクが最小である条件の下で蛋白質材料を分離することが、望まれる。そのような場合、尿素及びSDSのような添加剤は避けられ、そして、結果的にもたらされる分離は、分子の大きさ及び電荷の両方における差異に基づく。

今日、殆どの電気泳動分離は、スラブ又はオープンベッド内で行われる。しかしながら、そのような分離は、自動化又は定量化が困難である。異なった有効電荷を有する材料の高分離能分離は、オープンチューブ・フリーゾーン電気泳動及び細い毛管における等速回転電気泳動によって達成されている。更に、非常に鋭いピークを生成すべく、大量の流れが、電気浸透によってもたらされ得る。しかしながら、そのような高効率オープンチューブ電気泳動は、中位の分子量から高分子量のオリゴヌクレオチドの分離に対しては、通常、適用されない。何故ならば、これらの材料は、上述のように、非常に似通った有効電荷を有しているから

篩い操作として一般的に呼ばれており、制御された孔径を有するゲル母材を分離媒質として用いて行われる。そのような分離系においては、検体の有効電荷が同じであると、分離は、異なった大きさの分子種の、ゲル母材を貫通する能力における差異から生ずる。より小さい分子は、より大きい分子よりも、与えられた孔径のゲルを、相対的により速く貫通する。オリゴヌクレオチド並びに中位の分子量から高分子量のポリペプチド及び蛋白質は、通常、分子篩い電気泳動によって分離される。しかしながら、蛋白質材料の場合、分離されるべき材料を変性させてそれらが全て同じ有効電荷を有するようにすることが、一般的に必要である。これは、通常、SDS-PAGE誘導手順を用いて行われ、このSDS-PAGE誘導手順は、例えば、オックスフォード及びワシントンD. C. 在のアイ・アール・エル・プレス(IRL Press)によって1981年に発行された、ビー・ディー・ヘイムス(B.D. Hames)及びディー・リックウッド(D. Rickwood)編、“蛋白質のゲル電気泳動”に

である。更に、オープンチューブ電気泳動は、大きさに関する選択性を蛋白質材料に対して提供しない。このため、ゲル充填マイクロ毛管がオリゴヌクレオチドの高分離能分離を達成すべく使用され得るか否かという疑問、及び在来のSDS-PAGEの手順がそのようなマイクロ毛管で達成され得るか否かという疑問が、生ずる。生物科学における分離技法としての潜在的な重要性を与えられているマイクロ毛管ゲル電気泳動に対しては、驚くべきことに、注意が殆ど払われてこなかったが、本発明の開示によって明らかにされるように、これらの疑問に対する答は、肯定的である。

イエルテン(Hjerten)は、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィ(Journal of Chromatography)、第270巻、第1～6頁(1983年)に、“高性能電気泳動：高性能液体クロマトグラフィの電気泳動対応品(High Performance Electrophoresis: The Electrophoretic Counterpart of High Performance Liquid Chromatography)”と題する論文を発表している。この論文によると、彼は、

50～300ミクロンの内径及び100～200ミクロンの壁厚を有するチューブ内の架橋ポリアクリルアミドゲルを用いている。しかしながら、比較的大きい内腔の毛管、比較的低い印加電界及び大電流の使用、並びに電気浸透の不十分な抑制が幾分原因して、このやり方は、効率が低く、性能が余り良くない。また、彼は、米国特許第3,728,145号を得ており、この特許において、彼は、オープンチューブ内のフリーゾーン電気泳動における電気浸透を減少させるべく、大きい内腔のチューブの内壁に、メチルセルロース又はポリアクリルアミドのような中性の親水性物質を塗被する方法を開示している。その後の特許第4,680,201号において、イエルテンは、小さい内腔の毛管の内壁に、二官能価試薬によってその毛管の壁に結合させられるポリアクリルアミドの単分子重合性塗被材料を塗被する方法を開示している。これらの毛管は、フリーゾーン電気泳動に使用されるオープンチューブでもある。

は、一般的に疎水性材料であり、マイクロ毛管の壁の内表面上に反応官能性によって反応することのできる反応性官能基、例えばシラノール基を有する試薬に由来している。試薬の残りの部分は、ビニル単量体と反応することのできる第2の反応基と、重合した際に重合体ゲルを構成する、任意の架橋剤とを含んでいてもよい。

親水性重合体の層が、塗被材料の層とゲルとの間に任意に使用されてもよい。親水性重合体の層は、効果的に電気浸透を減少させ、カラムを安定化し、高電界（より正確には高電力）でのマイクロ毛管カラムの操作を思いがけなく可能にし、結果的に高分離能分離をもたらす。

本発明に係る改良されたゲル充填マイクロ毛管カラムは、次のようにして調製する。まず、マイクロ毛管の内表面を、それを塩基性材料もしくは酸性材料又は逐次的に両方に接触させることにより、活性化し、次いで、それを、マイクロ毛管の壁に共有結合することのできる適切な塗被試薬の溶液で処理し、マイクロ毛管の壁の内表面に共有

[発明が解決しようとする課題]

本発明者以外の研究者による、毛管でのゲル電気泳動の分野における少量の研究は、通常、カラムに帰着し、これらのカラムは、余り安定ではなく、しかも、高効率・高分離能分離を達成する、十分に高い電界に曝されることができなかった。優れた安定性、効率及び分離能を提供する、電気泳動用の改良されたゲル充填毛管カラムは、生物学において大きな価値を有しよう。

従って、本発明の目的は、優れた安定性、効率及び分離能を提供する、ゲル充填マイクロ毛管カラムを提供することである。

[課題を解決するための手段]

上記目的を達成する、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムは、マイクロ毛管と、このマイクロ毛管の内部穴内の重合体ゲルと、このマイクロ毛管の壁の内表面に共有結合すると共にその重合体ゲルにも好適に結合する塗被材料の薄層とを備えている。

マイクロ毛管の壁とゲルとの間の塗被材料の層

的に付着する塗被材料の層を形成する。次に、塗被したマイクロ毛管を、親水性重合体の溶液で任意に処理し、これを乾燥し、塗被材料の層上に吸着された親水性重合体の層を残す。この任意の工程に続いて、少なくとも1つの単量体、任意に少なくとも1つの架橋剤、少なくとも1つのラジカル源及び適切な触媒を含有する溶液で、マイクロ毛管を満たし、そして、この混合物をマイクロ毛管内で重合させ、マイクロ毛管の内腔を満たす重合体母材を最終的に形成する。最後の工程として、ゲル充填マイクロ毛管の一方の端部を、きれいに且つ真っ直ぐに切断する。

本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムは、非常に安定であり、しかも、300ボルト/cm以上の印加電界及びほぼ50マイクロアンペア以上の電流で良好に働く。これらの条件の下で、極めて高い分離能の分離が、非常に少量の材料について得られる。更に、本発明に係るマイクロ毛管カラムは、検体の混合物を、それらの分子量の対数の一次関数として分析することを示した。従っ

て、それらは、ナノグラム以下の量の未知の生体高分子についての正確な分子量決定を可能にする。

#### [実施例]

以下、添付図面を参照して本発明の実施例について説明する。

第1図に示されているように、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムは、マイクロ毛管10と、このマイクロ毛管の壁の内表面に共有的に結合した塗被材料の層12と、このマイクロ毛管の内腔内の重合体ゲル材料18とを含んでいる。

本明細書中で使用される用語「重合体ゲル」は、共有結合架橋ユニット、遠距離引力、水素結合、分子鎖の絡み合い等の種々の手段の内のいずれかによって結合させられている重合体鎖の三次元網目構造であって、液相中に分散させられているものを意味する。重合体網目構造は、ある程度の剛性を提供し、そして、系の他の成分が、重合体鎖の間の空間を占める。

マイクロ毛管は、電気泳動に使用される検出装置が、採用されたその具体的な材料と適切に作用

することができるならば、いずれの材料で作製されていてもよい。適切な材料として、例えば、ガラス、アルミナ、ベリリア、及びテフロンが挙げられる。好適に、マイクロ毛管は、石英ガラスで作製される。

マイクロ毛管の寸法は、重要である。何故ならば、与えられた電界に対し、マイクロ毛管の内径が小さくなるにつれ、具体的に印加された電界によって生成される、電流及び結果として生ずる加熱が減少するからである。それ故、最高の分離能での分離のためには、マイクロ毛管が最小の内径を有するということが、望ましい。しかしながら、本発明に係る改良されたマイクロ毛管の場合、この因子は、従来例におけるときよりも幾分重要ではない。従って、10～2000ミクロンの範囲内にある内径を有するマイクロ毛管が、本発明で機能を果たす。

使用される重合体ゲル材料18は、変化させられ得る細孔構造を有するいずれの重合体でもよい。それは、架橋されていても、いなくてもよい。好

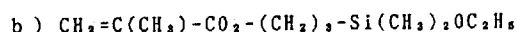
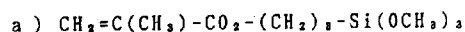
適に、重合体ゲルは、その細孔構造が単量体及び架橋剤の量並びに反応条件を変化させることによって変化させられるところの架橋重合体である。適切な重合体系の例は、ポリアクリルアミド、アガロース、及びアガロースとポリアクリルアミドとの混合物である。好適な重合体ゲル材料は、アクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミドとに基づいており、このN, N'-メチレンビスアクリルアミドは、架橋剤として働く。他の可能な架橋剤は、N, N'-(1, 2-ジヒドロキシエチレン)-ビスアクリルアミド、N, N'-ジアルリル酒石酸ジアミド、及びN, N'-シスタミン-ビスアクリルアミドである。更に、他の単量体及び架橋剤が、それら自身を当業者に示唆するであろう。

重合反応は、過硫酸アンモニウム又はN, N, N', N'-テトラメチレンエチレンジアミンによって好適に開始させられるが、当業者に知られている、他のラジカル重合開始剤が用いられてもよい。

第1図に示されているように、重合体ゲル材料18とマイクロ毛管の壁の内表面14との間の層12は、通常疎水性材料であり、マイクロ毛管の壁に化学的に結合し得る塗被試薬から得られる。この試薬は、通常、一端に適切な反応性官能基を有する分子鎖であるが、適切な官能価を有する非鎖型分子も、役に立つであろう。マイクロ毛管の壁に結合する、塗被試薬の端部は、マイクロ毛管の内表面のシラノール基又は他の反応性官能基と化学的に結合し得る反応性官能基を備えている。試薬のそのような反応性官能基は、トリアルコキシシラン、トリクロロシラン、モノエノレートシラン、ジエノレートシラン、トリエノレートシラン、及びアミノシランのような、典型的な反応性シランであり、これらのシランにおいては、ケイ素元素は、容易に置換され得る少なくとも1つの基を備えている。適切な塗被試薬の例は、アルキルジエトキシシラン、アルキルトリエトキシシラン、アルキルジメトキシシラン、アルキルトリメトキシシラン、アルキルエーテルジエトキシシラ

ン、アルキルエーテルトリエトキシシラン、アルキルエーテルジメトキシシラン、アルキルエーテルトリメトキシシランのような材料である。

好適な実施例においては、塗被試薬は、二官能価材料であり、重合体ゲル材料との共有結合を原則として形成し得る第2の官能基をも含んでいる。そのような官能基としては、ビニル基、置換ビニル基、又は開裂した際にラジカルを産出するあらゆる基が挙げられるが、実的な目的に対しては、ビニル基が好適である。何故ならば、ビニル基は、マイクロ毛管内で重合体ゲルを形成し、同時にそれをマイクロ毛管の壁に化学的に結合することが可能であるからである。代表的な二官能価試薬は、下記a)及びb)として示されている、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、及び3-メタクリルオキシプロピルジメチルエトキシシランである。



他の可能な二官能価試薬は、ビニルトリアセトキ

ルアルコール、ポリビニルアセテート及びポリビニルピロリドンのようなビニル材料の重合体が挙げられる。親水性重合体の分子量は、600~5000, 000ダルトン以上であり、好ましくは、ほぼ5000~200,000ダルトンの範囲内である。親水性重合体は、好適に線状重合体である。ポリエチレングリコールが、好適な親水性重合体である。ポリエチレングリコールが親水性重合体として用いられている改良されたマイクロ毛管の場合、ポリエチレングリコールは、約8000ダルトン以上の平均分子量を好適に有しているが、600~35,000ダルトンの範囲内の平均分子量を有する材料も、役に立つであろう。役8000ダルトン以上の平均分子量を有するポリエチレングリコールが好適であり、本発明において採用される水性系での使用に特に適している。

最高の分離能のためには、ゲル充填マイクロ毛管の少なくとも前端部が、マイクロ毛管の中心軸に垂直に、きれいに且つ真っ直ぐに切断されることが、必要である。マイクロ毛管の端部に

シシラン、ビニルトリ(ーメトキシエトキシ)シラン、ビニルトリクロロシラン、及びメチルビニルジクロロシランであるが、これらは、単に説明のためのものであり、これらが、全てではない。

二官能価試薬がそれに結合しないマイクロ毛管(例えばテフロン)の場合、マイクロ毛管は、層12を用いずに使用されてもよく、あるいは、マイクロ毛管の壁及び重合体ゲルに吸着する能力を有する重合体の層が、用いられてもよい。

親水性重合体の薄層が、塗被材料とゲルとの間に任意に使用され得る。本発明に有用な親水性重合体として、ポリオキシメチレンのようなポリオキシド; ポリエチレンオキシドのようなポリエーテル; ポリエチレンイミンのようなポリアルキルイミン; ポリアクリルアミド、ポリメチルアクリルアミド、ポリ-N, N-ジメチルアクリルアミド、ポリイソプロピルアミド及びポリアクリリルグリシンアミドのようなポリアミド; ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのようなポリアルキレングリコール; 並びにポリビニ

露出する重合体ゲル材料の表面が平坦でないと、試料を均一な狭いバンドで注入することが不可能となり、その結果、得られるピークが広がる。

本発明のゲル充填マイクロ毛管は、通常、下記のようにして調製される。まず、マイクロ毛管を、100℃超で通常は数時間加熱し、そして、その内表面を、塩酸又は硝酸の希薄溶液のような酸性材料及び/又はアンモニアガス又は塩基の溶液のような塩基性材料と接触させることにより、マイクロ毛管を活性化させる。加熱工程においては、110℃~200℃の温度が、好都合に使用され得る。そのような加熱の時間は、数時間から一晩以上まで変化させられ得る。一手順においては、活性化工程は、マイクロ毛管を、ほぼ20~35℃、好ましくは室温でほぼ2時間に亘って乾燥アンモニアガスでフラッシュすることにより、完了する。別の好適な手順においては、マイクロ毛管を上述のようにして加熱し、それをアルカリ金属水酸化物のような塩基の溶液、例えば0.1~1NのNaOH溶液で満たし、その溶液をマイクロ毛

管内に通常は20～35℃の範囲内の温度、好ましくは室温で少なくとも1～3時間、場合によっては一晩に亘って置いておき、その後、水でフラッシュすることにより、マイクロ毛管を活性化し得る。

マイクロ毛管を活性化するのに用いられる時間及び温度は、それらがマイクロ毛管を活性化するのに十分であり、もってマイクロ毛管と二官能価試薬との間の良好な結合が達成されるよう、選択される。

次に、活性化させたマイクロ毛管を、その容量の少なくとも20倍の、その壁を塗被するのに使用する試薬の溶液でフラッシュし、そして、このマイクロ毛管を、20～35℃の温度、好ましくは室温で、少なくとも1時間、好ましくは2時間以上に亘り、反応させるべく、その塗被試薬の溶液で満たしたまま放置する。別の手順は、満たしたマイクロ毛管を、約60℃で一晩、真空オープン内に置くことである。

塗被試薬の溶液は、アルコール、エーテル、ケ

ため、親水性重合体の被膜を殆ど乱さないようにして、マイクロ毛管を、その容量の1又は2倍の緩衝液でフラッシュする。

親水性重合体の任意の層がポリエチレングリコールである場合、ポリエチレングリコールを、ガス抜きされた、3回蒸留された水であって、約10℃まで冷却されたものと組み合わせ、次いで、攪拌しつつ、温度を室温まで徐々に上昇させる。沈殿物を含まない、きれいな透明な溶液が、結果的に生ずる。この溶液は、後述する親水性重合体の緩衝化された溶液を調製するのに使用される。

次に、単量体、架橋剤、開始剤及び重合反応用ラジカル源の別々の溶液を、その濃度は通常は7～8モルであるが、それよりも高くてもあるいは低くてもよい、水性尿素内で調製する。非変性であるべく意図されているゲルを、尿素又は他の変性添加剤を用いることなく調製し、良好に機能を果させる。これらの試薬の濃度は、溶液のアリコートが、採取され、所定の濃度の、単量体、架橋剤（もし使用されるならば）及び重合触媒を有す

トン又は中位の極性ハロゲン化溶剤のような非水溶剤内で調製され、通常、4～60重量%の塗被試薬を含有している。代表的な溶剤は、メタノール、ジオキサン、アセトン及び塩化メチレンである。塗被試薬をマイクロ毛管の内壁と反応させた後、マイクロ毛管をメタノールのような適切な溶剤で濯ぎ、更に水で濯ぐことにより、過剰の未反応試薬を任意に除去する。通常、チューブ容量の少なくとも100倍の溶剤及び水が、用いられる。

親水性重合体の任意の層を形成するため、塗被されたマイクロ毛管を、緩衝剤であって、後述するゲル充填剤の調製に使用されるものを含有する親水性重合体のガス抜きされた溶液で満たす。この溶液中の重合体の濃度は、通常、約5～10% (w/v) である。次に、マイクロ毛管を、約125℃の温度に維持されている真空オープン内に、数時間又は一晩、マイクロ毛管が乾燥するまで保持する。これは、マイクロ毛管を顕微鏡で検査することにより、容易に決定される。最後に、緩衝剤の過剰な結晶をマイクロ毛管の壁から除去する

る重合混合物を形成すべく混合され得るよう、選択される。これらの試薬のアリコートを混合する前に、溶液を、少なくとも1時間、別々にガス抜きする。このガス抜き作業は、この分野で知られているいくつかの方法で行われ得るが、基本的には、溶液を機械的に攪拌しつつ、あるいはそれらを超音波で攪拌しつつ、同時に、ほぼ20～30 mm Hgの低真空を適用することを包含する。これらの溶液の調製は、例えばヘイムズ(Hames)及びリックウッド(Rickwood)によって示されているように、この分野では知られている。

これらの種類の系における単量体の全濃度及び架橋剤の濃度は、通常、イエルテン(Hjerten)の用語法を用い、%T及び%Cとしてそれぞれ表現される。これに関しては、イエルテン、クロマトグラフィック・レビューズ(Chromatographic Reviews)、第9巻、第122～219頁(1967年)参照。本発明で好適に使用されるアクリルアミド N, N'-メチレンビスアクリルアミド系の場合、%T及び%Cは、次のように定義される。



$\%T = (\text{アクリルアミドのグラム数} + \text{ビスアクリルアミドのグラム数}) \div (100 \text{ ミリリットルの溶剤})$

$\%C = (\text{ビスアクリルアミドのグラム数} \times 100) \div (\text{ビスアクリルアミドのグラム数} + \text{アクリルアミドのグラム数})$

単量体及び架橋剤の濃度は、所望の高分子母材の多孔度に依りて前もって決定される。しかしながら、反応溶液中の開始剤及び重合触媒の濃度は、実験的に決定されなければならない。これは、所望の $\%T$ 及び $\%C$ を含有する試験溶液を調製し、使用される開始剤及び重合触媒の量を変化させることにより、行われる。SDS-PAGE電気泳動が考慮されている場合、ナトリウムドデシルスルフェートも、反応混合物内に、必要量、通常0.1% (w/v) 含まれる。これらの試験溶液は、電気泳動が実施されるべき温度以下で重合することを可能にし、そして、重合反応の進行は、ビニ

ートで別々に監視する。カラム内の重合反応及び別個の監視溶液内の重合反応は同じであるが、毛管内の反応はずっと速い。重合反応が45~60分の時間で本質的に終了したことを試験溶液が指示すると、反応を、上述した温度を維持しつつ、少なくとも更に2時間、好ましくは一晩に亘って進ませる。

別の好適な重合手順は、上述のようにしてマイクロ毛管を重合試薬の溶液で満たし、そのマイクロ毛管を5~10℃の温度にある冷蔵庫内に直ちに置き、一晩に亘って重合反応を進ませることである。

マイクロ毛管内の重合反応が本質的に完了した後、キャップをマイクロ毛管の端部から取り外し、マイクロ毛管の少なくとも一方の端部を、きれいに且つ真っ直ぐに切断する。これを成し遂げるための一方法は、切断されるべき端部を径の小さいテフロンチューブに緊密に納め、次いで、テフロンチューブに納められた端部を、マイクロ毛管の軸に垂直に、きれいに且つ真っ直ぐにミクロー

ル二重結合の吸収における減少を観測することによる紫外分光分析法により、監視する。あるいは、マイクロ毛管は、視覚的に観察し得る。開始剤及び重合触媒のレベルは、試験混合物の重合がほぼ45~60分のような合理的な時間で本質的に完了するよう、選択する。

正しい試薬濃度が決定すると、重合試薬の新しい混合物を調製し、泡を生じないように注意してマイクロ毛管内に注入する。マイクロ毛管を満たすべく使用する注射器にマイクロ毛管を接続すべく、内径の小さいテフロンチューブを使用する。マイクロ毛管を重合混合物で満たすと、注射器を取り外し、マイクロ毛管の両方の端部を、それらを隔壁(septum)内に挿入することによって栓をし、隔壁を、重合反応が起こっている間、維持する。

重合反応は、後続のマイクロ毛管カラムでの電気泳動で使用される温度以下で行う。重合反応が起こっている間、その反応を、紫外分光分析法によるビニル基に起因する吸収の減少を観測することにより、あるいは視覚的に、反混合物のアリコ

ムを用いて切断することであり、このミクローームは、テフロンチューブの鞘、マイクロ毛管材料及び重合体ゲルを、マイクロ毛管の端部に露出したゲル材料の表面を非常に滑らかにしつつ、切断する。あるいは、好適に、マイクロ毛管は、サファイア・カッターにより、その軸に直角に注意深く線を刻まれ、それを曲げることにより、きれいに破断され得る。切断作業が、露出した重合体ゲルの必要な平坦さを実際にもたらしたということを確認するため、切断したマイクロ毛管の端部を、顕微鏡で調査する。もし必要ならば、適切に平坦な端部が形成されるまで、更に切断を行う。マイクロ毛管の両方の端部は、通常、このようなやり方で処理するが、マイクロ毛管の前部において真っ直ぐに切断された端部を有することが、本当に必要なだけである。

その調製後、マイクロ毛管を、適切な電気泳動装置内に配置し、ほぼ100~150ボルト/cmの低電界を、約1時間に亘って印加する。もし非常にノイズの多いベースライン即ちゼロ電流状

態が得られるならば、これは、マイクロ毛管カラムが不適正に調製されたことを示す。この場合、新しいマイクロ毛管を調製しなければならない。

本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムを電気泳動に使用する場合、オープンチューブ・フリーゾーンマイクロ毛管電気泳動の分野における当業者には一般的に知られている装置及び技法が、使用される。例えば、ビー・エル・カーガー(B.L. Karger)、エイ・エス・コーエン(A.S. Cohen)及びエイ・グットマン(A. Guttman)、ジェイ・クロマトグ(J. Chromatg.)、第492巻、第585頁(1989年)；エム・ジェイ・ゴードン(M.J. Gordon)、エクス・ハン(X. Hung)、エス・エル・ペンタニー・ジュニア(S.L. Pentaney, Jr.)及びアール・エヌ・ゼイアー(R.N. Zare)、サイエンス(Science)、第242巻、第224頁(1988年)；並びにジェイ・ダブリュ・ジョルジェンソン(J.W. Jorgenson)及びケイ・ディー・ルカクス(K.D. Lukacs)、サイエンス(Science)、第222巻、第266～272頁(1983年)参照。

起こすべく、ほぼ50～100ボルト/cmの電界が、数秒間印加される。その後、マイクロ毛管は“運転(running)”緩衝液に移され、所望の電気泳動電界が印加され、電気泳動が通常の方法で実行される。

マイクロ毛管を冷却するため、冷却ジャケット又は関連装置が、マイクロ毛管の周囲に、このマイクロ毛管の前端部及び後端部のみを除く、その大部分の長さに亘って使用される。なお、上記前端部及び後端部は、緩衝液中にそれぞれ浸漬されると共に、電気泳動装置の検出器にそれぞれ接続される。冷却流体は、上記ジャケットを介して循環させられると共に、所望される温度に維持される。あるいは、電気的に制御される機械的な冷却装置が、マイクロ毛管カラムの周囲に使用され得る。そのような“能動”冷却は、所望のマイクロ毛管温度を維持することにおいて、強制空気又は自然対流よりも効果的である。

分析用高分離能分子篩電気泳動を実施する方法は、分離されるべき検体を含有する試料のアリコ

毛管ゲル電気泳動においては、2つの化合物間の分離は、試料の大きさ、試料中のイオン材料及びゲル濃度を含み、バンドの鮮鋭度に影響を及ぼす全ての因子によって影響される。後者の因子が特に重要である。何故ならば、ゲル濃度が高過ぎると、検体はカラムから完全に締め出される一方、それが低過ぎると、分子篩い作用が殆ど又は全く起こらないからである。単一のゲル濃度は、蛋白質材料又はオリゴヌクレオチドの全ての混合物の分離に対して最適ではない。具体的な試料に対して適切なゲル濃度を選択することが、必要である。マイクロ毛管における電気泳動に影響を及ぼす他の重要な変数は、印加される電界及び使用される電流である。試料は、所謂“電気泳動注入”技法によって注入されるが、注射器成層注入のような、この分野で知られている他の技法も、使用され得る。電気泳動注入技法においては、電気泳動マイクロ毛管の前端部が、適切な極性の電極を収容する試料溶液中に浸漬され、そして、少量の試料溶液の、マイクロ毛管の端部内への電気泳動を引き

ートを、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラム内に電気泳動的に注入する工程と、100～300ボルト/cm以上の電界を印加する工程と、通常約50マイクロアンペア未満の電流がマイクロ毛管を通過することを許容する工程と、分離された検体を、それらが検出器を過って泳動する際に、機器を用いて逐次的に検出・測定する工程とを含んでいる。

本発明に係るゲル充填マイクロ毛管は、検体を、それらの分子量の対数の関数として、直線状に分離する。従って、標準の電気泳動条件下での未知の検体の移動度を、標準材料の分子量の対数をそれらの標準材料の移動度に対してプロットした検量線図と比較することにより、未知の検体の分子量を決定することが、可能である。

従って、検体の分子量を決定する方法は、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムを調製し、電気泳動作業パラメータの標準値を選択し(通常、印加電界は100～300ボルト/cm又はそれ以上であり、電流は約50マイクロアンペア未満

である)、分子量が既知であるいくつかの標準検体を含有する標準溶液のアリコートを上記マイクロ毛管に注入し、電気泳動作業パラメータの選択された標準値をマイクロ毛管に適用して標準液を分離し、その電気泳動条件下での既知標準液の移動度を測定し、各標準材料についての分子量の対数を標準作業条件下での移動度に対してプロットし、同一条件且つ同一カラムで未知の溶液を電気泳動的に分析し、その中に含有されている検体の移動度を測定し、検量プロットとの比較からこれらの検体の分子量を最終的に決定することからなっている。

重合体ゲル充填剤とマイクロ毛管の壁との間の、親水性重合体の任意の層を含む、壁塗被材料の層を有する改良されたマイクロ毛管カラムは、そのような毛管壁被膜を有さないカラムよりも、より長い保存寿命及び使用時におけるより良好な安定性を示す。最も重要で且つ思いがけなかったことに、本発明に係る改良されたマイクロ毛管カラムは、高分離能分離が短い分析時間で達成されるこ

及びφX174RF/Hae III DNA片は、ファルマシア(Pharmacia)から入手した。水は、3度蒸留し且つ脱イオンした。本発明で好適に採用された石英ガラスマイクロ毛管チューブは、最初は、テキサス州オースチン在のサイエンティフィック・グラス・エンジニアリング・インコーポレーテッド(Scientific Glass Engineering Inc.)から、後には、アリゾナ州フェニックス在のポリマイクロ・テクノロジーズ・インコーポレーテッド(Polymicro Technologies, Inc.)から入手した。ポリマイクロ・テクノロジーズは、種々の他の寸法のチューブをも供給した。マイクロ毛管の端部に線を刻むのに使用されるサファイア・カッターは、01760 マサチューセッツ州サウス・ナティック、プレザント・ストリート22在のアーリング・エレクトロニクス・コーポレーション(Earling Electronics Corp.)から入手した。

マイクロ毛管チューブを満たすのに、小径のテフロンチューブ(0.2~0.25ミリメートルの内径)を使用した。0.2ミクロンの孔径を有

とを可能にする、高電界強度で作業させられ得る。

## 実 験 の 部

アクリルアミド、N, N'-メチレンビスアクリルアミド、N, N, N', N'-テトラメチレンエチレンジアミン(TEMED)、過硫酸アンモニウム、ナトリウムドデシルスルフェート、TRIS緩衝剤及び磷酸水素二ナトリウムは、全て、オハイオ州クリーブランド在のシュワルツ/マン・バイオテック(Swartz/Mann Biotech)から入手した、超純級材料即ち電気泳動級材料であった。他の供給源からの幾分純度の低いアクリルアミドは、それを3回再結晶させ且つイオン交換樹脂での処理によって脱イオンすることにより、適切に精製し得た。尿素は、新しく入手し、水/メタノールから3度再結晶させた。蛋白質は、ミズーリ州セント・ルイス在のシグマ・ケミカル・カンパニー(Sigma Chemical Company)から入手し、入手した状態で使用した。ポリ(デオキシアデニル酸)

するナイロン66・フィルタ膜又はメチルセルローズ・フィルタ膜により、全ての溶液を濾過した。分析試料は、使用に先立ち、-20℃で凍結させておき、実験用のこれらの試料のアリコートは、4℃で貯蔵した。SDS-PAGE作業用の蛋白質は、この分野で知られている方法で調製した。

マサチューセッツ州キングストン在のインストゥルメンテーション・フォー・リサーチ・アンド・ディヴェロップメント・インコーポレーテッド(Instrumentation for Research and Development, Inc.)によるSoma S-3207検出器を使用し、エス・テレブ(S. Terabe)他、アナリ・ケム(Anal. Chem.)、第56巻、第111~113頁(1984年)に記載されているようにして、その検出器をマイクロ毛管作業用に改造した。データは、ネルソン・アナリティカル・A/D・インターフェイス(Nelson Analytical A/D Interface)・モデル762SAを用いてデジタルの形に変換し、IBM PC/XTコンピュータを用いて記憶した。この分野で知られている他

の装置も役に立つであろう。

1.0% T、3.3% C及び0.1% SDSを有する  
ゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

75ミクロンの内径、30ミクロンの壁厚及びポリイミド被膜を有する石英ガラスマイクロ毛管チューブを用いた。このチューブの40～45cmの長さを、ゲル充填マイクロ毛管カラムの調製に取り出した。このチューブの一方の端部の1cmの部分から、燃焼によってポリイミド被膜を除去した。この端部を、電気泳動装置の検出器に最終的に接続した。

マイクロ毛管チューブを、空気中約120℃で一晩加熱し、次いで、ほぼ2時間に亘って約30℃の乾燥アンモニアガスでフラッシュした。本明細書において約30℃で実行したと報告されている上記作業及び他の作業は、室温で行われたものであり、この室温は、概して約30℃±約3℃である。次に、3-メタクリルオキシプロピルトリメ

シ、そして磷酸水素二ナトリウムの添加によってpHを8.6に調節することにより、緩衝液を調製した。

アクリルアミド及びN, N'-メチレンビスアクリルアミドの溶液は、アクリルアミド29gとN, N'-メチレンビスアクリルアミド1gとを100mlの緩衝液中で組み合わせることによって調製し、30%の%T及び3.3%の%Cを有する溶液を得た。

過硫酸アンモニウムの溶液は、過硫酸アンモニウム0.2gを2mlの緩衝液中に溶解させることによって調製した。

緩衝剤、単量体及び過硫酸アンモニウムの溶液を、0.2ミクロンのフィルタで別々に濾過し、そして、20～30mmHgの真空を適用しつつ超音波で処理することにより、2時間に亘ってガス抜きした。

10mlのアクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液を、緩衝液で30mlに希釈し、%T=10%及び%C=3.3%を有する最終的な溶液を

トキシシランの50%メタノール溶液100μlを約30℃の温度でマイクロ毛管を通過させてマイクロ毛管を二官能価試薬溶液で満たしたままにしておき、長さの短いテフロンチューブ（これも二官能価試薬溶液で満たされている）を介してマイクロ毛管の端部を接続し、そして、閉塞し且つ試薬を充填したマイクロ毛管を約30℃で一晩放置した。次に、テフロンチューブをマイクロ毛管の一方の端部から取り外し、そして、各々250μlのメタノール及び水で連続的にマイクロ毛管をフラッシュして未反応の二官能価試薬を除去した。次に、塗被されたマイクロ毛管を電気泳動装置の検出器内に組み込み、そして、処理したマイクロ毛管及び未処理のマイクロ毛管の15cmの部分を実験用に取り出した。処理したマイクロ毛管を20cmよりも幾分長く切断し、そして、その“前”端部にテフロン製の鞘を取り付けた。

7モルの尿素溶液100ml中にTRIS緩衝剤1.1gを溶解させ、EDTA0.01g及びナトリウムドデシルスルフェート0.1gを添加

得た。この溶液の1mlアリコートをし、過硫酸アンモニウム溶液及びTEMEDの量を変化させて実験的に処理し、そして、使用すべき過硫酸アンモニウム及びTEMEDの正しい量を決定するため、重合時間を監視した。2.5μlのTEMED及び4μlの過硫酸アンモニウムの添加が約45分の重合時間を与えるということが、確かめられた。

アクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液の10mlアリコートをし、緩衝液で30mlに希釈し、2.5μlのTEMED及び4μlの過硫酸アンモニウムを添加し、そして、過剰な50μlのこの重合混合物を、マイクロ毛管を出て行く泡が観察されなくなるまで、マイクロ毛管に注入した。マイクロ毛管内への泡の導入を防止するため、注入を続けつつ、テフロンチューブから注入注射器を注意深く取り外した。最後に、マイクロ毛管の両方の端部を“運転”緩衝液中に浸漬し、そして、約30℃で重合を進行させた。重合混合物の残りの部分の重合を、外部から監視した。重合が完了

したように見えた後、完全な重合を確実にするため、更に2時間に亘って系を放置し、次いで、20 cmのマイクロ毛管泳動距離（前端部から検出器まで）で、マイクロ毛管の前端部をマイクロームで切断した。最終的なゲル充填マイクロ毛管カラムを、100ボルト/cmの印加電界下で1時間に亘って評価し、満足し得るものであることを見出した。

4つの蛋白質、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、トリプシノゲン及びペプシンの混合物を、この分野で知られている標準的なやり方で、SDS-PAGE電気泳動用に調製し、次いで、100ボルト/cmの電界を15秒間印加することにより、この溶液の試料を、マイクロ毛管カラムに電気泳動的に注入した。電気泳動は、400ボルト/cm及び24  $\mu$ Aの電流で、20 cmの泳動距離に亘って行った。その結果を第2図に示す。

マイクロ毛管カラムで行われ得るということを示している。

#### 分子篩い作用の証明

第6図に、試験されたマイクロ毛管カラムの各々において試験された蛋白質の移動度の対数が、%Tに対して“ファーガソン(Ferguson)”プロットでプロットされている。分子篩い分離に対して期待される通り、ゲル濃度がゼロにおける、外挿された移動度が、本質的に同一である。第7図に、“ファーガソン”プロットの傾きが、分離された材料の分子量と直線的に相関していることが示されており、このことは、分子量決定に対するゲル充填マイクロ毛管カラムの有用性を示している。

#### 3 % T 及び 5 % C を有するゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

75ミクロンの内径、約150ミクロンの壁厚

#### % T = 7.5 % 及び 5 % を有するゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

アクリルアミド-ビスアクリルアミドの原液の適切に希釈されたアリコートを用いることによってもたらされる % T = 7.5 % 及び 5 % を、それらがそれぞれ有することを出いて、正確に上述のようにして別のマイクロ毛管カラムを調製した。上記4つの蛋白質の混合物を、上述したものと同一条件の電気泳動により、これらのマイクロ毛管カラムで分離した。それらの結果を第3図及び第4図にそれぞれ示す。

#### 分子量の決定に関するゲル充填マイクロ毛管カラムの有用性の証明

第5図に、試験されたゲルの各々において試験された蛋白質の分子量の対数がそれらの移動度の直線的な関数であるということが、示されており、このことは、分子量決定が本発明に係るゲル充填

及びポリイミド被膜を有する石英ガラスマイクロ毛管チューブを用いた。このチューブの40~45 cmの長さを、ゲル充填マイクロ毛管の調製に取り出した。このチューブの一方の端部の2 cmの部分から、燃焼によってポリイミド被膜を除去した。この端部を、電気泳動装置の検出器に最終的に接続した。

マイクロ毛管チューブを、1 M KOH 溶液で満たし、室温で一晩放置した。次に、マイクロ毛管を、カラム容量の約20倍の量の、室温の、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランのHPLC級メタノール50%溶液で濯いだ。次に、二官能価試薬溶液で満たしたマイクロ毛管を、隔壁で栓をし、一晩放置した。

7モルの尿素溶液100 ml中にTRIS緩衝剤1.1 gを溶解させ、EDTA 0.01 gを添加し、そしてホウ酸の添加によってpHを8.3に調節することにより、緩衝液を調製した。

アクリルアミド及びN, N'-メチレンビスアクリルアミドの溶液は、アクリルアミド19 gと

N, N'-メチレンビスアクリルアミド1 gとを100 mlの緩衝液中で組み合わせることによって調製し、20%の%T及び5%の%Cを有する溶液を得た。

過硫酸アンモニウムの溶液は、過硫酸アンモニウム0.2 gを2 mlの緩衝液中に溶解させることによって調製した。

緩衝剤、単量体及び過硫酸アンモニウムの溶液を、0.2ミクロンのフィルタで別々に濾過し、そして、20~30 mmHgの真空を適用することにより、2時間に亘ってガス抜きした。

1.5 mlのアクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液を、緩衝液で10 mlに希釈し、%T=3%及び%C=5%を有する最終的な溶液を得た。この溶液を、0.2 μmのフィルタで濾過し、約20~22 mmHgの減圧下で一晩ガス抜きした。

アクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液の0.5 mlアリコートに、電気泳動級TEMEDの5% v/v溶液7.5 μl及び過硫酸アンモニウム

の5% w/v溶液7.5 μlを添加し、そして、過剰な50 μlのこの重合混合物を、マイクロ毛管を出て行く泡が観察されなくなるまで、マイクロ毛管に注入した。マイクロ毛管内への泡の導入を防止するため、注入を続けつつ、テフロンチューブから注入注射器を注意深く取り外した。次に、マイクロ毛管の両方の端部を隔壁で栓をし、そして、マイクロ毛管を、冷蔵庫内に置き、その間に重合が起こるところの一晩、5~10℃に維持した。最後に、20 cmのマイクロ毛管泳動距離(前端部から検出器まで)で、マイクロ毛管の前端部を切断した。最終的なゲル充填マイクロ毛管カラムを、100ボルト/cmの印加電界下で1時間に亘って評価し、満足し得るものであることを見出した。

公称40~60塩基のポリ(デオキシアデニル酸)オリゴマの混合物の溶液を、60ボルト/cmの電界を5秒間印加することにより、マイクロ毛管カラムに電気泳動的に注入した。電気泳動は、300ボルト/cm及び12 μAの電流で、20

cmの泳動距離に亘って実行した。その結果を第8図に示す。

#### 6% T及び0% Cを有するゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

架橋剤を用いず、アクリルアミド原液を、アクリルアミド30 gを100 mlの緩衝液と組み合わせることによって調製し、これを5倍に希釈して6% Tを有する作業用アクリルアミド溶液を生成したということを除いて、上述した3% T及び5% Cマイクロ毛管カラムと同じやり方で第3のマイクロ毛管カラムを調製した。72~1300塩基対の範囲内にあるφX174RF/Hae III DNA片の混合物を、60ボルト/cmの電界を10秒間印加することにより、マイクロ毛管カラムに電気泳動的に注入した。電気泳動は、300ボルト/cm及び12 μAの電流で、20 cmの泳動距離に亘って実行した。その結果を第9図に示す。

#### 6% T、0% C及び0.1% SDSを有するゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

緩衝液が、100 ml当り0.1 gのナトリウムドデシルスルフェートを含有しているということを除いて、上述した6% T及び0% Cマイクロ毛管カラムと同じやり方で第4のマイクロ毛管カラムを調製した。

リゾチームは、11より大きいpIを有しており、従って、pH=7.6では正に帯電して負電極へと泳動するものと思われるが、SDS-リゾチーム錯体は負に帯電し、従って、この錯体は、正電極に向かって泳動する。リゾチームの溶液を、60ボルト/cmの電界を15秒間印加することにより、マイクロ毛管カラムに電気泳動的に注入した。電気泳動は、300ボルト/cm及び17 μAの電流で、20 cmの泳動距離に亘って実行した。その結果を第10図に示す。

7. 5% T、3. 3% C、0. 1% SDS、及び  
ゲルを取り巻くポリエチレングリコールを有する  
ゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

第11図に示されているように、本発明に係る別の好適な実施例のゲル充填マイクロ毛管カラムは、マイクロ毛管10と、塗被材料の層12であって、マイクロ毛管の壁の内表面14に共有結合しているものと、層12上に吸着された親水性重合体の層16と、このマイクロ毛管の内腔内の重合体ゲル材料18とを備えている。

75ミクロンの内径、約150ミクロンの壁厚及びポリイミド被膜を有する石英ガラスマイクロ毛管チューブを使用した。このチューブの40～45cmの長さを、ゲル充填マイクロ毛管カラムの調製に取り出した。このチューブの一方の端部の2cmの部分から、燃焼によってポリイミド被膜を除去した。この端部を、電気泳動装置の検出器に最終的に接続した。

マイクロ毛管チューブを、空気中約120℃で

さに切断した。

緩衝液は、7モルの尿素溶液100ml中にTRIS緩衝剤1. 1gを溶解させ、EDTA 0. 01g及びナトリウムドデシルスルフェート0. 1gを添加し、そしてホウ酸の添加によってpHを8に調節することにより、調製した。

アクリルアミド及びN, N'-メチレンビスアクリルアミドの溶液は、アクリルアミド29gとN, N'-メチレンビスアクリルアミド1gとを100mlの緩衝液中で組み合わせることによって調製し、30%の%T及び3. 3%の%Cを有する溶液を得た。

過硫酸アンモニウムの溶液は、過硫酸アンモニウム0. 2gを2mlの緩衝液中に溶解させることによって調製した。

緩衝剤、単量体及び過硫酸アンモニウムの溶液を、0. 2ミクロンのフィルタで別々に濾過し、そして、20～30mmHgの真空を適用することにより、2時間に亘ってガス抜きした。

0. 75gのアクリルアミド-ビスアクリルア

ミドを加熱し、1M KOH溶液で満たし、そして、室温で一晩放置した。次に、マイクロ毛管を、カラム容量の約20倍の量の、室温の、3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランのHPLC級メタノール50%溶液で濯いだ。次に、二官能価試薬溶液で満たしたマイクロ毛管を、125℃の温度及びほぼ2mmHgの真空に維持されている真空オープン内に置き、一晩放置した。

次に、塗被したマイクロ毛管を、約35, 000ダルトンの公称分子量を有する6%w/vポリエチレングリコールと、0. 1Mトリスポラート緩衝液(pH=8)と、7M尿素を有するポリエチレングリコールとを含有する、前もってガス抜きした溶液で注意深く満たし、そして、約125℃の温度及び約2mmHgの真空に維持されている真空オープン内の一晩放置し、その後、マイクロ毛管が乾燥していることを、顕微鏡による調査で確かめた。処理したマイクロ毛管を、チューブ容量の約1～2倍の量の緩衝液(下記)でフラッシュし、次いで、窓から20cmよりも幾分長い長

ミド溶液を10mlの緩衝液に添加し、%T=7. 5%及び%C=3. 3%を有する最終的な溶液を得た。この溶液を、0. 2μmのフィルタで濾過し、約20～22mmHgの減圧下で一晩ガス抜きした。

アクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液の0. 5mlアリコートに、電気泳動級TEMEDの5%v/v溶液7. 5μl及び過硫酸アンモニウムの5%w/v溶液7. 5μlを添加し、そして、過剰な50μlのこの重合混合物を、マイクロ毛管を出て行く泡が観察されなくなるまで、マイクロ毛管に注入した。マイクロ毛管内への泡の導入を防止するため、注入を続けつつ、テフロンチューブから注入注射器を注意深く取り外した。次に、マイクロ毛管の両方の端部を隔壁で栓をし、そして、マイクロ毛管を冷蔵庫内に置き、その間に重合が起こるところの一晩、5～10℃に維持した。最後に、20cmのマイクロ毛管泳動距離(前部から検出器まで)で、マイクロ毛管の前端部をマイクロトームで切断した。最終的なゲル充填マイ

クロ毛管カラムを、100ボルト/cmの印加電界下で1時間に亘って評価し、満足し得るものであることを見出した。

4つの蛋白質、チトクロームC、リゾチーム、ミオグロビン及びトリブシノゲンの混合物を、この分野で知られている標準的なやり方で、SDS-PAGE電気泳動用に調製し、次いで、100ボルト/cmの電界を15秒間印加することにより、この溶液の試料を、マイクロ毛管カラムに電気泳動的に注入した。電気泳動は、300ボルト/cm及び15~17 $\mu$ Aの電流で、20cmの泳動距離に亘って実行した。その結果を第12図に示す。

#### 7. 5% T、3. 3% C、及びゲルを取り巻くポリエチレングリコールを有するゲル充填マイクロ毛管カラムの調製及び試験

SDSを含まないということを除いて、上述のようにして第2のマイクロ毛管カラムを調製した。

第 1 表

<u>E (V/cm)</u>	<u>I (<math>\mu</math>A)</u>
100	6
200	12
300	18
400	22
500	28
600	33
700	40

これらのデータは、申し分なく作製されたカラムを示していると共に、カラムが700V/cmの印加電界下で作業し得るということをも証明している。

#### 〔発明の効果〕

以上のように、本発明によれば、優れた安定性、効率及び分離能を提供する、ゲル充填マイクロ毛管カラムが提供される。

ポリ(デオキシアデニル酸)の混合物を、300ボルト/cm及び12~14 $\mu$ Aの電流での電気泳動により、注入し且つ分離した。その結果を第13図に示す。

#### マイクロ毛管カラムの品質制御試験

それらの寿命の間、種々の印加電界で電気泳動電流を測定することにより、ゲル充填マイクロ毛管カラムを、安定性及び再現性に関して周期的に試験した。良好な状態で申し分なく作製したカラムは、印加した電界の範囲に亘って一定の抵抗を示し、しかも、これは、反復可能である。この試験においては、測定した電流を、印加した電界(V/cm)に対してプロットした。一定の傾き(抵抗)を有する直線は、カラムが良好であることを示している。SDS-ゲルマイクロ毛管カラムについての典型的な実験データを、第1表に示す。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムの端部の拡大斜視図である。

第2図は、10%の全単量体、3. 3%の架橋剤及び0. 1%のSDSを含有する、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムにおける、4つの標準的な蛋白質、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、トリブシノゲン及びペプシンの通電クロマトグラムである。緩衝液のpHは8. 6であり、そして、電気泳動は、400ボルト/cm及び24 $\mu$ Aの電流で、20cmの泳動距離に亘って行った。

第3図は、7. 5%の全単量体を含有するカラムを使用したということを除いて同一の電気泳動条件下での、第2図に示されているものと同じ蛋白質の通電クロマトグラムである。

第4図は、5%の全単量体を含有するカラムを使用したということを除いて同一の電気泳動条件下での、第2図及び第3図に示されているものと同じ蛋白質の通電クロマトグラムである。



第5図は、本発明に係る3つの異なるゲル充填マイクロ毛管カラムにおける、試験された蛋白質の分子量の対数とそれらの移動度との間の関係を示す図である。

第6図は、第2図、第3図及び第4図からのデータのファーガソン・プロットを示す図である。

第7図は、ファーガソン・プロットの傾きと標準的な蛋白質の分子量との関係を示す図である。

第8図は、3%全単量体及び5%架橋剤を含有し、SDSを含有しない、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムにおける、公称40~60塩基の、ポリ(デオキシアデニル酸)オリゴマの混合物の通電クロマトグラムである。緩衝液のpHは8.3であり、そして、電気泳動は、300ボルト/cmの印加電界及び12マイクロアンペアの電流で、20cmの泳動距離に亘って行った。

第9図は、制限酵素Hae IIIでの切断によって作製された $\phi$ X174RFのDNA片の混合物の通電クロマトグラムである。6%全単量体を含有し、架橋剤及びSDSを含有しない、本発明に

係るゲル充填マイクロ毛管カラムを使用した。緩衝液のpHは8.3であり、そして、電気泳動は、300ボルト/cmの印加電界及び12マイクロアンペアの電流で、20cmの泳動距離に亘って行った。

第10図は、6%全単量体及び0.1%SDSを含有し、架橋剤を含有しない、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムにおける、リゾチームの通電クロマトグラムである。緩衝液のpHは7.6であり、そして、電気泳動は、300ボルト/cmの印加電界及び17マイクロアンペアの電流で、20cmの泳動距離に亘って行った。

第11図は、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムであって、塗被材料の層上に吸着された親水性重合体の薄層が任意に用いられているものの拡大端面図である。

第12図は、7.5%全単量体、3.3%架橋剤及び0.1%(w/v)SDSを含有する、第11図に示されている、本発明に係るゲル充填マイクロ毛管カラムにおける、4つの標準的な蛋白

質、チトクロームC、リゾチーム、ミオグロビン及びトリブシノゲンのSDS-PAGE分離を示す図である。緩衝液のpHは8.6であり、そして、電気泳動は、300ボルト/cmの印加電界及び12~15マイクロアンペアの電流で、20cmの泳動距離に亘って行った。

第13図は、SDSを含有していないということを除いて、第12図に関して記載されているのと同様なマイクロ毛管カラムにおける、第12図に示されている分離で採用されたのと同じ電気泳動条件下での、ポリ(デオキシアデニル酸)オリゴマの電気泳動分離を示す図である。

10…マイクロ毛管

12…層

14…内表面

16…層

18…重合体ゲル材料

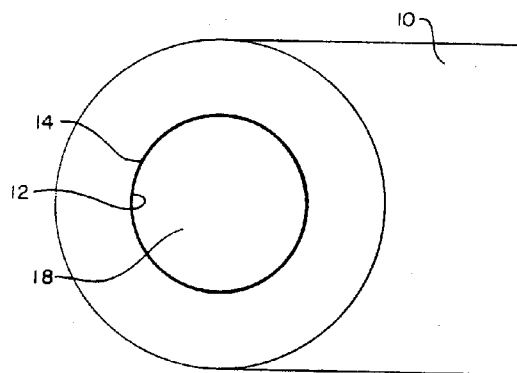


FIG. 1

代理人 秋 元 輝 雄

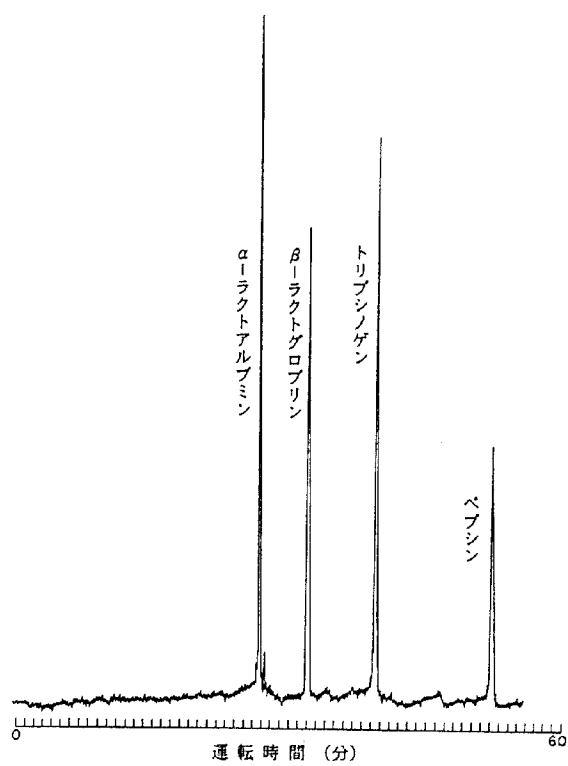


FIG. 2

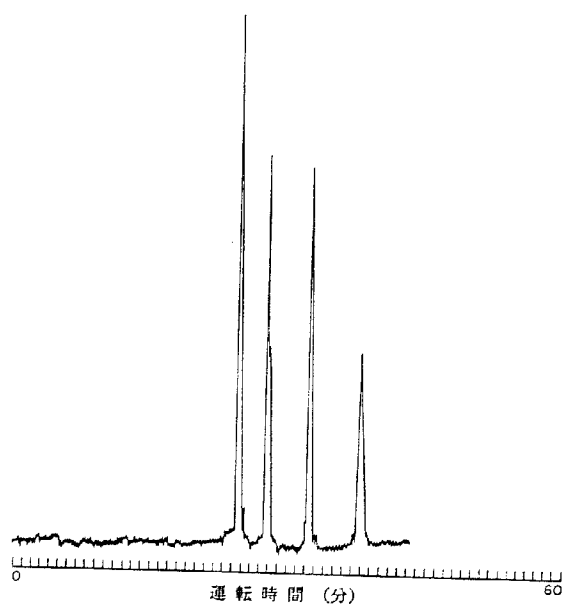


FIG. 3

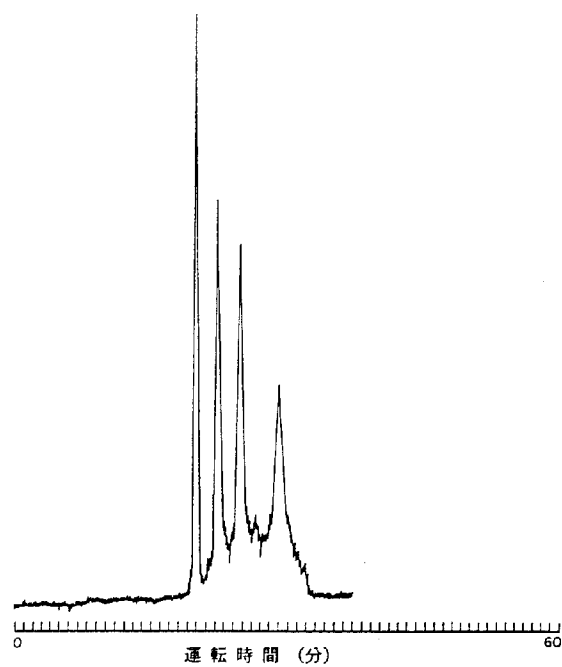


FIG. 4

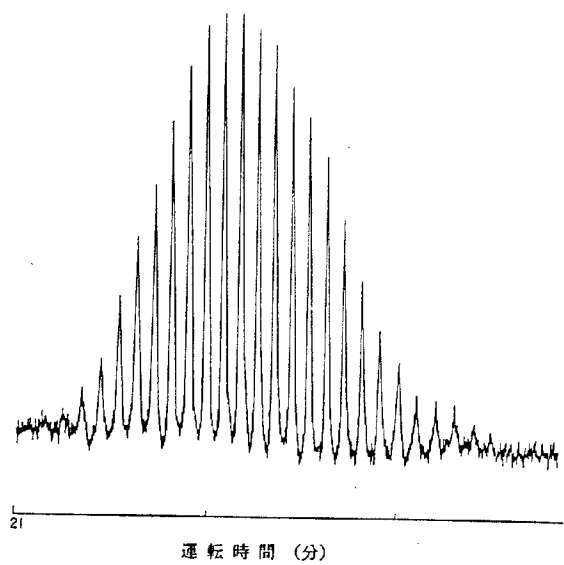


FIG. 8

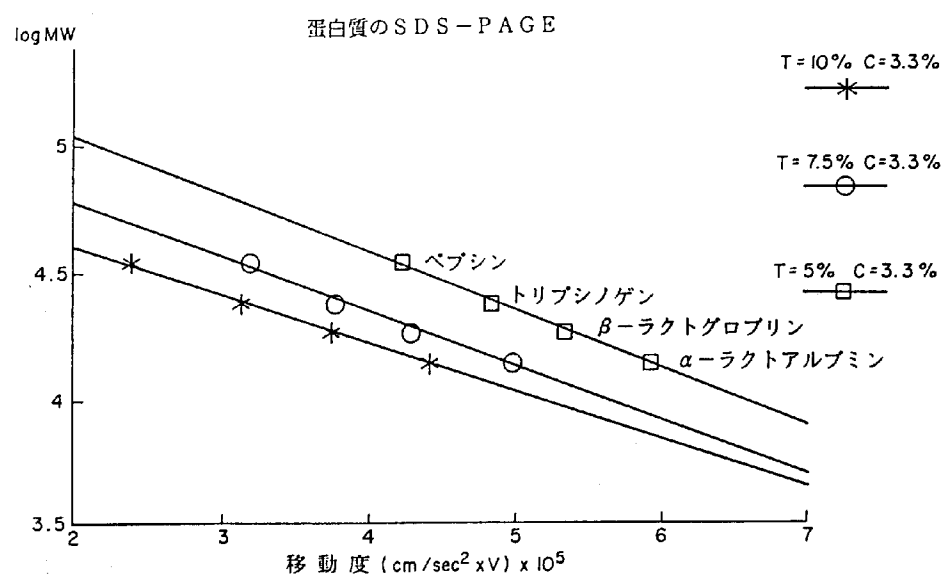


FIG. 5

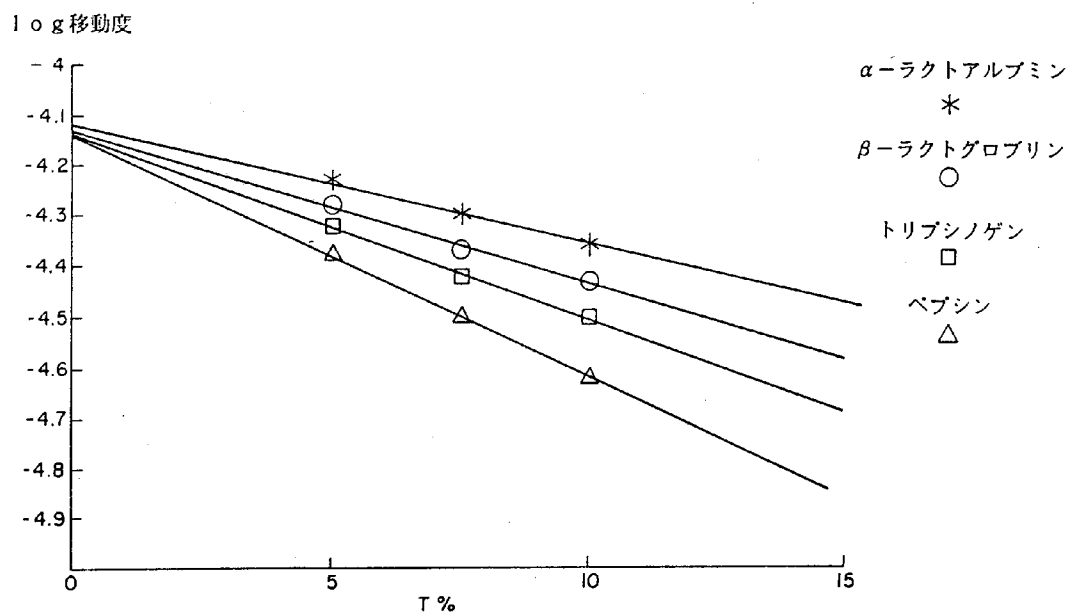


FIG. 6

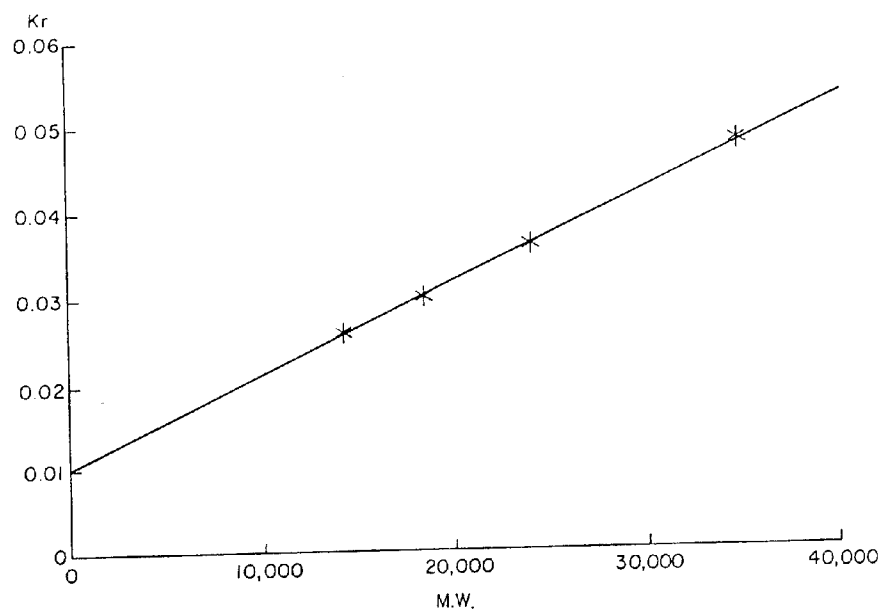


FIG. 7

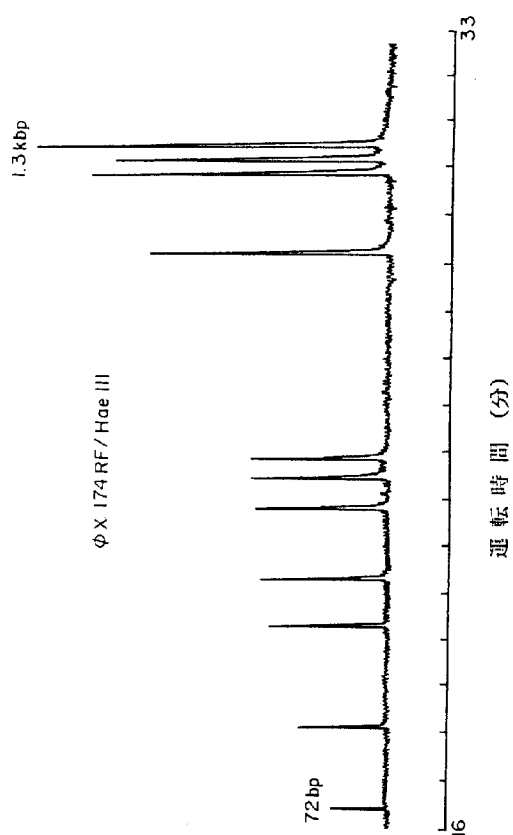


FIG. 9

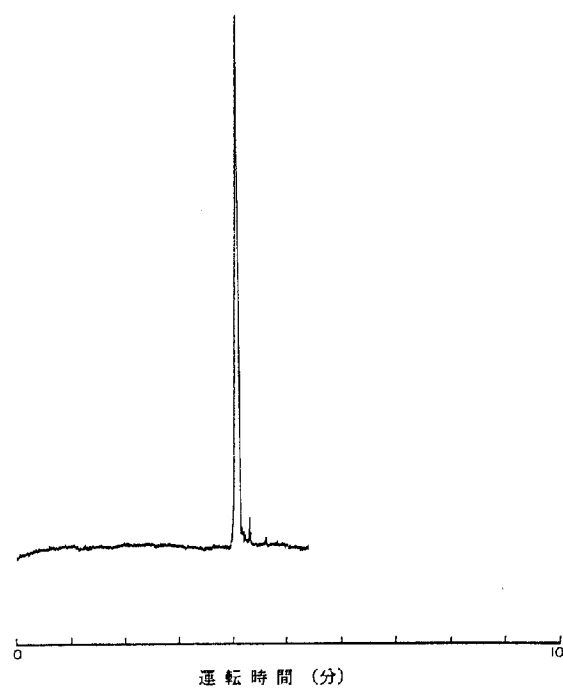


FIG. 10

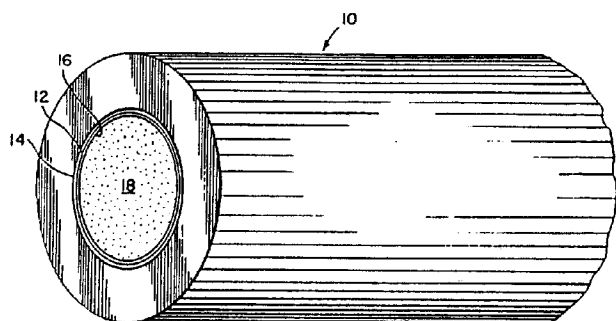


FIG. 11

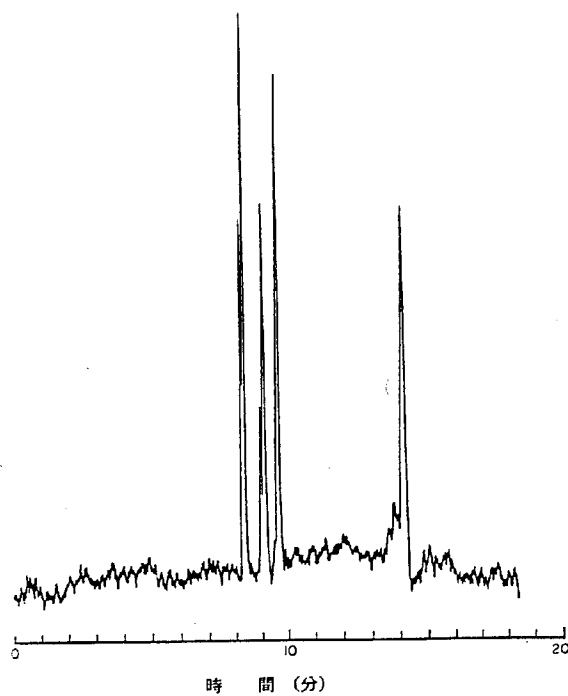


FIG. 12

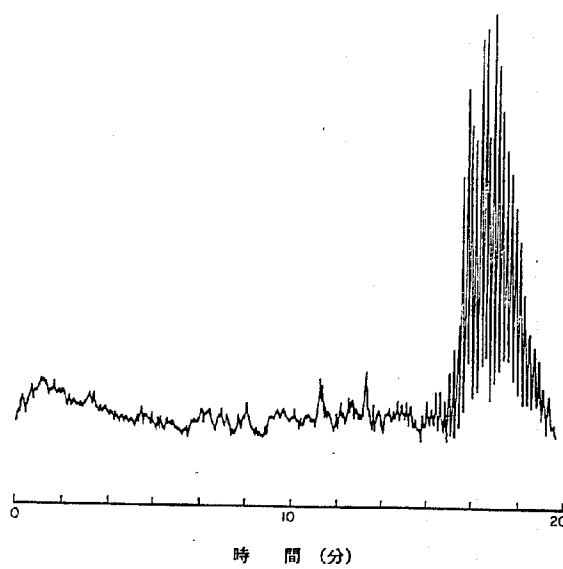


FIG. 13

第1頁の続き

優先権主張

⑫1989年10月13日⑬米国(US)⑭421609

⑯発明者

デイヴィッド・エヌ・ アメリカ合衆国 02155 マサチューセッツ州 メドフォ  
ード、 ミステイック・バレー・パークウエー 3920、  
#717